

幹細胞のエピゲノム状態とPIポリアミドの効果に関する研究

日大生産工 (院) ○福岡 正也

日大生産工 野呂 知加子

1. まえがき

幹細胞は自分と同じ能力を持つ細胞に分裂する能力(自己複製能)と皮膚や赤血球などの体細胞を作り出す能力(分化能)をもつ細胞である。この幹細胞が分化する際に上皮間充織転換 (EMT:Epithelial Mesenchymal Transition) という変化をする。幹細胞は上皮細胞と間充織細胞の二つに変化しながら、位置や形態を変化させ、器官の形成や治療を行う。この時 Snail、Slug、Twist などの転写因子が E-カドヘリンの発現を調節することで EMT が引き起こされると言われている。この EMT と細胞接着分子カドヘリンの関係に着目し、カドヘリン遺伝子発現の低下が引き金となり、Snail、Slug、Twist などが発現し、その結果 EMT が起こるといふ従来説とは異なる経路の可能性を調べることを目的とする。

そのために用いるのが PI ポリアミドである。PI ポリアミドとは、N-メチルピロール単位(Py)、N-メチルイミダゾール単位(Im)及び γ -アミノ酪酸単位を含む低分子有機化合物である。DNA の C-G 塩基対に対しては Py / Im 対が、G-C 塩基対に対しては Im / Py 対が、A-T 塩基対及び T-A 塩基対に対しては Py / Py 対がそれぞれ DNA と結合する。そのため、PI ポリアミドの構造を設計し、プロモーターに結合させれば、転写を阻害すればその配列から生み出される物質を抑制することができる。この特性を用いて、カドヘリン遺伝子発現の低下を先に起こすことができる。

これらの事実から、幹細胞である ES 細胞(胚性幹細胞)、EC 細胞(胚性腫瘍細胞)を用いて、この二つの細胞にカドヘリンを抑制するように設計した PI ポリアミドを導入し、3 日間の細胞の状態の比較を行ったところ EC 細胞は EMT を引き起こしたが、ES 細胞は逆に結合が強くなった。これは、ES 細胞が胚盤胞の内部細胞塊由来であり、EC 細胞が卵筒胚の胚盤葉上層由来であるため、二つの細胞はメチル化状態が異

なることが原因であると考えられる。そのため、ジーンチップにより ES 細胞と EC 細胞で発現の異なる遺伝子の中から細胞接着に関連する遺伝子を抽出し、遺伝子とエピゲノム状態の関連性を調べることを目的とする。

2. 実験方法

6cm dish に 3ml の 1%ゼラチンを添加し、30 分置いた。そして、ゼラチンを吸引除去し、滅菌水で 6cm dish を洗浄し、30 分以上常温で乾燥させた。

凍結した ES 細胞と EC 細胞を溶かし、全量 15ml チューブに移し、それと同じ量の培地を加えた。この 15ml チューブを 3 分 15000rpm で遠心し、沈澱した細胞以外を吸引除去した。この細胞に 3ml の培地を加え、ピペッティングをし、6cm dish にすべて添加した。この dish を 37°C インキュベーターで育て、細胞が一定量になった場合、Mouse PI ポリアミド F を濃度が $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培地で希釈し、3 時間以上インキュベーター内で温めた。育てた細胞の培地を取り除き、PBS で 6cm dish を洗浄した。次に 0.25% トリプシンを 1.5mL 加え、インキュベーター内で 30 秒置き、1.5mL の培地を加え、全量を 15mL チューブに移した。そして、3 分 15000rpm で遠心し、沈澱した細胞以外を吸引除去した。培地を加え、細胞をピペッティングし、セルカウントにより細胞数を測定した。この細胞数から培地 3mL あたり細胞数が 1.0×10^5 個の細胞が含まれるよう計算し添加した。ピペッティングを行い、6cm dish に細胞を含んだ培地を 3mL 添加し、インキュベーター内に 24 時間置いた。24 時間後培地を吸引除去し、HBSS で 6cm dish を洗浄後、スクレーパーにより細胞をはがし、1.5mL チューブに移した。この細胞から RNA を抽出し、ジーンチップにより遺伝子解析を行った。

Study on the epigenomic state of stem cells and the effect of PI polyamide
Masaya FUKUOKA and Chikako Y NORO

3. 結果および考察

発現の違う遺伝子の中から細胞接着に関連する遺伝子の中でも EMT に関連する遺伝子をまとめた。

表 2, EC 細胞および ES 細胞の遺伝子の発現の違い

遺伝子名	Scales ignal (EC)	発現の 有 無 (EC)	Scales ignal (ES)	発現の 有 無 (EC)
Vcam1	635.7	P	0.7074	P
Claudin1	39.57	P	3.577	A
Ceacam1	7.973	A	260.7	P
Pecam1	79.29	A	542.1	P
Onecut2	99.21	P	2.412	A

EC 細胞で顕著に発現している Vcam1 は CD44 という細胞接着分子の結合することで細胞の移動度を上昇させる¹⁾。また、Claudin1 は slug の発現を促進する²⁾。ES 細胞で顕著に発現している Ceacam1 は Twist の発現を抑制することで EMT を制御している³⁾。Pecam1 および Onecut2 は発現することで EMT を抑制する⁴⁾⁵⁾。このため、EC 細胞では EMT を引き起こすような遺伝子が発現し、ES 細胞では EMT を抑制するような遺伝子が発現していることがわかった。この結果は EC 細胞および ES 細胞の PI ポリアミド導入時の EMT の有無と一致するものであると考えられる。

4. まとめ

EC 細胞と ES 細胞では発現が大きく異なり、EMT の発生にも大きく関わっていることがわかった。だが、エピゲノム状態の違いによる発現の違いと断できる遺伝子を見つけることはできていないため、より多くの遺伝子解析が必要となる。

「参考文献」

- 1) Pei-Chen Wang, Ching-Chieh Weng, You-Syuan Hou, Shu-Fang Jian, Kuan-Te Fang, Ming-Feng Hou, and Kuang-Hung Cheng., “Activation of VCAM-1 and Its Associated Molecule CD44 Leads to Increased Malignant Potential of Breast Cancer Cells” *Int J Mol Sci*, 15 巻, 3 号, (2014), p3560–3579
- 2) Suh Y, Yoon CH, Kim RK, Lim EJ, Oh YS, Hwang SG, An S, Yoon G, Gye MC, Yi JM, Kim MJ, Lee SJ., “Claudin-1 induces epithelial–mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells”, *Oncogene*, 32 巻, 41 号, (2013), p4873-4882
- 3) Daniel Wicklein, Benjamin Otto, Anna Suling, Eva Elies, Georg Lüers, Tobias Lange, Susanne Feldhaus, Hanna Maar, Jennifer Schröder-Schwarz, Georg Brunner, Christoph Wagener and Udo Schumacher., “CEACAM1 promotes melanoma metastasis and is involved in the regulation of the EMT associated gene network in melanoma cells”, *Scientific Reports*, 8 巻, 1 号, (2018), p11893
- 4) Josephine M. Enciso, Dita Gratzinger, Todd D. Camenisch, Sandra Canosa, Emese Pinter, and Joseph A. Madri., “Elevated glucose inhibits VEGF-A–mediated endocardial cushion formation: modulation by PECAM-1 and MMP-2”, *The Journal of Cell Biology*, 166 巻, 4 号, (2003), p605-614
- 5) Sun Y, Shen S, Liu X, Tang H, Wang Z, Yu Z, Li X, Wu M., “MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma”, *Mol Cell Biochem*, 390 巻, 1-2 号, (2014), p19-30